

氏名	原武 光輔		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 7733 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	The Analysis of Proteasome Associated Protein, Ecm29 (プロテアソーム相互作用タンパク質Ecm29の解析)		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治

## 論 文 の 要 旨

選択的タンパク質分解は様々な生命現象の制御に重要である。この選択的タンパク質分解を担うプロテアソームは巨大な複合体型のプロテアーゼである。プロテアソームは、活性中心である20S core particleと19S regulatory particle、PA28やPA200といった制御因子が会合することにより活性化し、分解機能を発揮することが知られている。20S core particleと19S regulatory particleが会合したプロテアソームは特に26Sプロテアソームと称され、ユビキチン化されたタンパク質を分解する役割を果たすことが知られている。

Ecm29は26Sプロテアソームと結合するタンパク質として発見され、26Sプロテアソームの安定化にはたらくことが報告された。しかしながら、出芽酵母プロテアソームの解析によりEcm29は20S core particleと19S regulatory particleとの解離を促進するはたらきや、19S regulatory particleが有するATPaseの阻害にはたらく因子として、26Sプロテアソームの分解機能を抑制することも報告されている。哺乳動物の細胞においてEcm29は小胞体やゴルジ体との表面に局在し、プロテアソームの細胞内局在の制御やシグナル伝達経路に寄与することが報告されている。しかしながら、Ecm29の哺乳動物におけるプロテアソーム制御機構や生理的役割の多くは未解明である。

本研究では、動物個体におけるEcm29の役割を調べるためにEcm29の遺伝子欠損マウスの機能解析を行った。Ecm29の遺伝子欠損マウスは見かけ上健康であり、いずれの臓器においても異常な形態は観察されなかった。Ecm29のプロテアソーム依存性タンパク質分解への寄与を調べるために、臓器粗抽出液中のプロテアソームのペプチダーゼ活性を比較した。その結果、野生型とEcm29遺伝子欠損マウス間で顕著な差異は認められず、Ecm29欠損はペプチダーゼ活性に対し影響を及ぼさないことが分かった。また、組織切片に対してユビキチン抗体を用いた免疫組

織化学的解析を行い、ユビキチンの蓄積を比較したが、野生型とEcm29遺伝子欠損マウスでは同程度の蓄積量を示した。以上の結果より、Ecm29欠損はユビキチン化タンパク質の分解に対しても特に影響を及ぼさないことが考えられた。次にプロテアソームをグリセロール密度勾配遠心にて沈降定数依存的に分画し、その構成サブユニットをウェスタンブロット解析で比較解析した。野生型とEcm29遺伝子欠損マウス間で各画分における発現量に差異は生じておらず、Ecm29欠損は26Sプロテアソームの形成や他の制御因子との会合には影響を及ぼさないことが考えられた。以上、通常状態ではEcm29欠損による顕著な影響は認められなかった。

次にストレス応答性を解析した。Ecm29遺伝子欠損マウスから胎児線維芽細胞を単離し、過酸化水素に対する感受性試験を行った。その結果、Ecm29遺伝子欠損細胞は野生型よりも高い生存率を示すことが明らかになった。この生存率の向上の原因を解明するために、細胞抽出液を密度勾配遠心法によって分画し、酸化ストレス誘導下でのプロテアソームの構成サブユニットを比較した。その結果、野生型では酸化ストレス処理下で26Sプロテアソームが解離するのに対し、Ecm29遺伝子欠損細胞ではそのような解離は認められず、26Sプロテアソームの状態に留まることが明らかになった。また野生型細胞では26Sプロテアソームの解離とともにそのペプチダーゼ活性が低下したのに対して、Ecm29遺伝子欠損細胞ではペプチダーゼ活性の低下は認められなかった。そこで酸化ストレスによって障害を受けたタンパク質の分解について解析した結果、野生型では26Sプロテアソームの活性低下とともに、障害されたタンパク質の蓄積が認められ、ユビキチン化タンパク質も同様に蓄積した。それに対して、Ecm29遺伝子欠損細胞では障害タンパク質やユビキチン化タンパク質の蓄積は認められず、効率良く分解されていた。すなわち、Ecm29遺伝子欠損細胞では26Sプロテアソーム活性が低下せず異常タンパク質を効率的に分解除去できるため、酸化ストレスに対して高い生存率を示したと考えられた。

本研究は19S regulatory particleがストレスによって積極的に解離する機構の存在することを示し、Ecm29がその制御に関与することを明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

本研究は真核生物に広く保存されているプロテアソーム制御因子 Ecm29 の機能を、遺伝子欠損動物を用いて解析したものであり、その重要性は高い。プロテアソームは 50 以上のサブユニットから構成される巨大な複合体型プロテアーゼであり、その構成因子は様々なストレスによって変化することが知られている。原武氏は Ecm29 遺伝子欠損細胞のストレス感受性を解析し、Ecm29 が酸化ストレス時のプロテアソーム解離に重要であることを発見した。本研究成果はプロテアソームの新たな制御機構と分子機序を明らかにした点で高く評価できる。

平成 28 年 2 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。